

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-188069

(43)Date of publication of application : 10.07.2001

(51)Int.Cl.

G01N 33/68

(21)Application number : 11-375372

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY  
CORP  
HIROSHIMA INDUSTRIAL  
TECHNOLOGY ORGANIZATION

(22)Date of filing : 28.12.1999

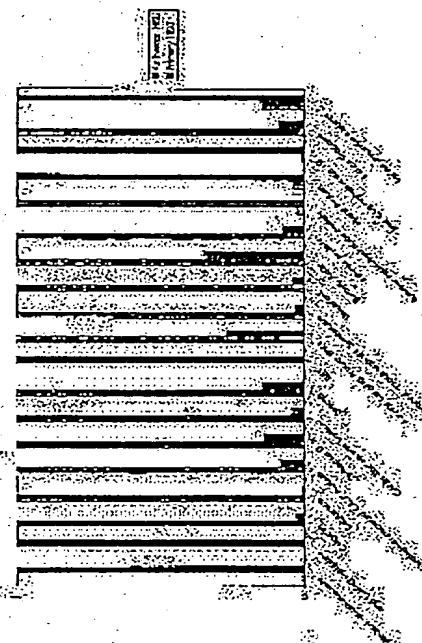
(72)Inventor : DUNN B CHRISTENSEN  
YOSHIZATO KATSUTOSHI  
IMAMURA KUNIHIKO  
MIYAMOTO YUKA

## (54) HEPATOPATHY DIAGNOSING METHOD

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a diagnosing method capable of simply and speedily diagnosing hepatopathy and more accurately making diagnoses.

SOLUTION: The amount of expression of one protein or more selected from proteins in which hepatic stellate cells separated from livers express themselves: an A group of proteins formed of  $\gamma$ -actin, Cofilin, Calcycline, Calgizzarin, Cartilage-associated CAPS, Cathepsin D, Destrin, F-actin capping protein  $\beta$ , Farnesyl pyrophosphate synthetase, Galectin,  $\gamma$ -enolase, and Serine protease is measured to determine the disorderly state of a liver to which hepatic star cells in which the amount of expression of the protein or proteins have increased in comparison with normal hepatic star cells belong.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

<http://www19.ipdl.ipo.go.jp/PA1/result/detail/main/wAAAKLaOvLDA413188069P...> 2004/01/23

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-188069

(P2001-188069A)

(43) 公開日 平成13年7月10日 (2001.7.10)

(51) Int.Cl.

識別記号

F I

テマコード\* (参考)

G 0 1 N 33/68

G 0 1 N 33/68

2 G 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平11-375372

(22) 出願日 平成11年12月28日 (1999.12.28)

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(71) 出願人 596063056

財団法人広島県産業技術振興機構

広島県広島市中区千田町3丁目7-47

(72) 発明者 ダン ビー クリステンセン

広島県東広島市鏡山2-365-2-103

(72) 発明者 吉里 勝利

広島県東広島市八本松南7-22-13

(74) 代理人 100093230

弁理士 西澤 利夫

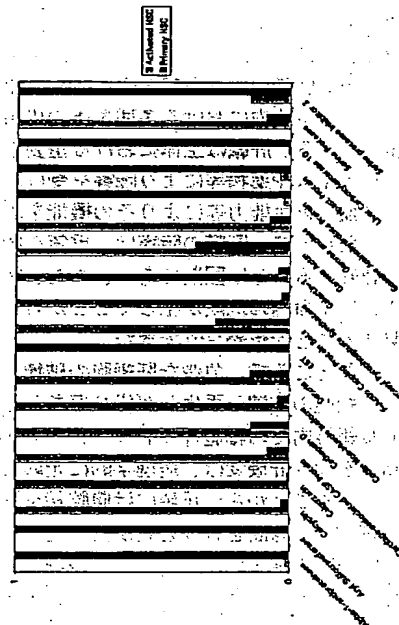
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝障害の診断方法

(57) 【要約】

【課題】 肝障害を簡略にかつ迅速に診断できるとともに、よりの確に診断を下すことができる診断方法を提供する。

【解決手段】 肝臓から分離した肝星細胞が発現するタンパク質:  $\alpha$ -actin、Cofilin、Calcycline、Cagizzarin、Cartilage-associated CAPS、Cathepsin D、Destrin、F-actin、capping protein  $\beta$ 、Farnesyl pyrophosphate synthetase、Galectin、 $\alpha$ -enolaseおよびSerine proteaseからなるタンパク質A群より選択される1以上のタンパク質の発現量を測定し、正常肝星細胞と比較してこ(れら)のタンパク質の発現量が増加している肝星細胞が属していた肝臓が障害状態にあると判定する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 肝臓から分離した肝星細胞が発現するタンパク質： $\gamma$ -actin、Cofilin、Calcycline、Calgizzarin、Cartilage-associated CAPS、CathepsinD、Destrin、F-actin capping protein  $\beta$ 、Farnesyl pyrophosphate synthetase、Galectin、 $\gamma$ -enolaseおよびSerine proteaseからなるタンパク質A群より選択される1以上のタンパク質の発現量を測定し、正常肝星細胞に比較してこ（これら）のタンパク質の発現量が増加している肝星細胞が属していた肝臓が障害状態にあると判定することを特徴とする肝障害の診断方法。

【請求項2】 肝臓から分離した肝星細胞が発現するタンパク質： $\alpha$ -1-antiproteinase、Aryl sulfotransferase、ESS:AA376979、Guanine aminohydrolase、HPAST protein、Liver carboxylesterase 10およびSerine protease inhibitor 3からなるタンパク質B群より選択される1以上のタンパク質の発現量を測定し、正常肝星細胞に比較してこ（これら）のタンパク質の発現量が減少している肝星細胞が属していた肝臓が障害状態にあると判定することを特徴とする肝障害の診断方法。

【請求項3】 請求項1記載のタンパク質A群および請求項2記載のタンパク質B群のそれぞれ1種以上のタンパク質の発現量を測定し、正常肝星細胞に比較して、A群タンパク質の発現量が増加し、かつB群タンパク質の発現量が減少している肝星細胞が属していた肝臓が障害状態にあると判定することを特徴とする肝障害の診断方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】この出願の発明は、肝障害の診断方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】肝臓は、蛋白質合成、尿素代謝および糖代謝等といった生体内における多種多様の代謝を担う中心的な臓器である。肝臓は生体内における重要な臓器であるため、ウイルスや薬物等により障害を受けた場合であっても、旺盛な再生能力等によりその機能を維持しようとする。したがって、肝臓の障害は、重篤な機能不全に陥るまで認知することは困難であり、また、障害を認知したときには生命への危険が生じることから、これを早期に発見することが求められてきた。

【0003】ところで、急激な肝細胞の破壊を生じる急性肝炎、肝細胞の破壊と再生とが繰り返される慢性肝炎および肝臓組織内での細胞外マトリックスの産生亢進と異常蓄積とを伴う肝硬変は、病理学的に定義づけられた疾患概念であることから、正確には腹腔鏡や肝生検を実施して病理学的に診断を行う必要があった。しかしながら、腹腔鏡や肝生検を反復して行うと病理学的に診断を確定するのは容易ではない。そこで、血液生化学的検査やUS、CT等の画像検査による診断が開発されてき

た。

【0004】例えば、肝硬変の診断に際しては、肝細胞の機能障害を反映して生じる血小板やアルブミン、コリンエステラーゼおよびコレステロール等の減少、血漿遊離アミノ酸異常および $\gamma$ -グロブリン、IV型コラーゲンやヒアルロン酸等の上昇等が診断の指標として用いられている。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、元来、肝臓は予備能力や再生能力の大きい臓器であるために、軽度の肝障害が存在している場合でも、多くの血液生化学的検査に異常が認められないことがしばしば生じることから、これらを指標とした早期診断が必ずしも現実を反映しないという問題があった。

【0006】また、US、CT等の画像検査を実施するためには、画像診断装置を備えた施設が必要となるだけでなく、診断に際して時間と手間とを要するため、実際には早期診断に用いえないという問題があった。

【0007】この出願の発明は、以上のとおりの従来技術の問題点に鑑みてなされたものであって、肝障害を簡略にかつ迅速に診断できるとともに、よりの確に診断を下すことができる診断方法を提供することを課題としている。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】この出願は、前記の課題を解決するための第1の発明として、肝臓から分離した肝星細胞が発現するタンパク質： $\gamma$ -actin、Cofilin、Calcycline、Calgizzarin、Cartilage-associated CAPS、Cathepsin D、Destrin、F-actin capping protein  $\beta$ 、Farnesyl pyrophosphate synthetase、Galectin、 $\gamma$ -enolaseおよびSerine proteaseからなるタンパク質A群より選択される1以上のタンパク質の発現量を測定し、正常肝星細胞に比較してこ（これら）のタンパク質の発現量が増加している肝星細胞が属していた肝臓が障害状態にあると判定することを特徴とする肝障害の診断方法を提供する。

【0009】またこの出願は、第2の発明として、肝臓から分離した肝星細胞が発現するタンパク質： $\alpha$ -1-antiproteinase、Aryl sulfotransferase、ESS:AA376979、Guanine aminohydrolase、HPAST protein、Liver carboxylesterase 10およびSerine protease inhibitor 3からなるタンパク質B群より選択される1以上のタンパク質の発現量を測定し、正常肝星細胞に比較してこ（これら）のタンパク質の発現量が減少している肝星細胞が属していた肝臓が障害状態にあると判定することを特徴とする肝障害の診断方法を提供する。

【0010】さらにこの出願は、第3の発明として、前記の第1発明記載のタンパク質A群および第2発明記載のタンパク質B群のそれぞれ1種以上のタンパク質の発現量を測定し、正常肝星細胞に比較して、A群タンパク

質の発現量が増加し、かつB群タンパク質の発現量が減少している肝星細胞が属していた肝臓が障害状態にあると判定することを特徴とする肝障害の診断方法。

【0011】一般に、何らかの要因により肝細胞が質的に変化、あるいは数が減少して肝障害に陥ると肝機能が低下し場合によっては肝不全に至る。肝不全は、急性肝不全と慢性肝不全とに大別されるが、これら肝不全の場合はもちろん、肝不全に至るに至らない肝障害のいずれにおいても、肝細胞の破壊と再生とが惹起される結果、クッパー細胞や内皮細胞等による星細胞の活性化が生じることになる。星細胞は、類洞の内皮細胞を取り囲み収縮機能を備えることから、その機能の一つとして類洞の血流調節を担うと考えられている。しかしながら、星細胞は、肝障害等が引き金となり活性化されると、コラーゲン等の細胞外マトリックス成分を産生し、これに続く肝組織内での細胞外マトリックスの産生亢進と異常蓄積とにより、類洞の毛細血管化や偽小葉の形成が生じる。その結果、肝臓における線維化が進行して肝線維症に至ることになる。

【0012】この出願の前記発明は、正常肝星細胞に比して活性化星細胞で発現量が増加または減少する特定のタンパク質に着目し、それぞれの発現量の増減を指標として肝障害を診断する方法である。

【0013】以下、この出願の発明について、実施形態を詳しく説明する。

【0014】

【発明の実施の形態】この出願の前記発明において、そのタンパク質発現量を測定する星細胞は、例えば、Nycodenz（ニコデンズ）密度勾配遠心法等により生体より採取された肝臓由来の星細胞である。

【0015】星細胞のタンパク質発現量は、例えば、星細胞の全mRNAを鋳型とする定量的RT-PCR法により測定することができる。すなわち、前記A群およびB群のタンパク質のアミノ酸配列および/またはそのcDNA配列がデータベース（SwissProtおよびGenBank等）により公知であるため、これらの公知配列に基づいて作成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして、PCRを行うことができる。また、後述する実施例に示したように、星細胞の全タンパク質を2次元ポリアクリルアミド電気泳動（2-D PAGE）により展開し、このゲル泳動パターンをプロテオーム解析する方法を採用することもできる。このプロテオーム解析法の場合には、前記A群およびB群の各タンパク質が、正常星細胞も活性化星細胞もゲル上の同一位置にスポットを形成するため、両者を比較してその濃度や大きさから発現量の増減を容易に判定することができる。また、A群およびB群の全19種のタンパク質の発現レベルを同時に測定することができるため、高い精度で診断を下すことが可能である。

【0016】なお、この出願の発明に係る診断方法は、

各種の基礎研究や臨床的な診断にはもちろんのこと、医薬品の治験等の臨床検査や化学物質等の安全評価等の各種用途に対して適用できるのはいうまでもない。

【0017】以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例に限定されるものではない。

【0018】

【実施例】肝線維症ラットの肝星細胞におけるタンパク質発現パターンを分析した。

#### 1. 方法

（1）肝線維症ラットの作成と、活性化肝星細胞の調製  
雄のウィスターラット（200 g）に、50%四塩化炭素オリブオイル溶液0.2 mlを1週間に2回、連続8週間にわたって皮下注射した。最終注射の1日後、ラットから肝臓を単離し、その一部組織を10%ホルマリン固定して組織学的に検査し、残りの組織は液体窒素中で保管した。同様に処理した別のラットから、文献（Eur. J. Biochem. 213:815-823, 1993）に記載の方法に従って、星細胞を分離した。星細胞は、洗浄の後、DMEM培地（10% FBS、70 mg/Lペニシリン、100 mg/Lストレプトマイシン含有）に浮遊させ、プラスチック培養プレートで培養した。なお、常法により測定した細胞純度は常に95%以上であった。

【0019】また、四塩化炭素を注射する以外は前記の方法と同様にして、正常肝星細胞を単離した。さらに、この正常肝星細胞を前記の培地で9日間培養して、活性化星細胞を調製した。以下、肝線維症ラットから単離した活性化星細胞を「in vivo活性化星細胞」、培養による活性化細胞を「in vitro活性化星細胞」と記載する。

#### （2）分泌タンパク質を含む細胞培地の調製

正常肝星細胞およびin vivo活性化星細胞を、培養プレート上で24時間培養した後、細胞を無血清DMEM培地で5回洗浄し、無血清DMEM培地（20 mg/mlヒトPDGF含有）で培養し、培養3日目に培地を回収した。また、正常肝星細胞を上記と同様にして7日間培養し、無血清DMEM培地で洗浄した後、さらに2日間、無血清培地で培養し、培地を回収した。各培地は数分間遠心分離し、フィルターを通して残渣を除去した後、-80℃で保存した。

#### （3）試料の前処理

培養星細胞をPBSで5回洗浄し、溶解バッファー（7 M urea, 2 M thiourea, 4%(w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio] propanesulfonic acid, 2%(v/v) Ampholine, 1% dithiothreitol (DTT) 含有）中に $10^7$ 細胞/mlで溶解し、-8℃で保存した。

【0020】各星細胞から分泌されたタンパク質を含む培養培地は、5kDa cut-offのUltrafree遠心フィルター（Millipore社製）によって、15 mlから終量約100 μlに濃縮し、次いで、1:15の割合で溶解バッファーと混合し、-80℃で保存した。

#### （4）2次元ポリアクリルアミド電気泳動（2-D P

AGE)

タンパク質サンプルを、ゲル内再水和法によりImmobilized Dry Strips (pH 4-7, 18 cm, Pharmacia Hoefer社製) に一夜供した。ゲル当たり $10^6$  星細胞タンパク質を供した。また、2 日間にわたって $10^7$  星細胞から分泌されたタンパク質をゲル当りに供した。

【0021】1次元ゲル電気泳動は、Pharmacia Hoefer Multiple II electrophoresis chamberを用いて行った。2次元SDS-PAGEは、Iso-Dalt system (Pharmacia Hoefer社製) を用いた9-18%アクリルアミド勾配ゲルにおいて行った。タンパク質は銀染色によって可視化し、2-DゲルはEpson ES 800 scanner (Seiko Epson社製) により画像化した。イメージ分析と2-Dゲルプロテオームデータベースの検索はMelanie II 2-D PAGE software package (version 2.2) (Bio-Rad社製) により行った。

(5) ゲル中のタンパク質の消化  
タンパク質スポットをゲルから切り出し、100 mM ammonium carbonate中で再水和した。ゲル断片はMilliQ水で2回洗浄し、15 mM potassium ferricyanideと50 mM sodium thiosulfateで脱色し、MilliQ水で2回、100 mM ammonium bicarbonateで1回洗浄し、不透明な白色に戻るまでacetonitrile中で脱色し、最終的に気化器中で乾燥させた。次いで、ゲル断片をトリプシン消化バッファーで再水和し、ゲル中のタンパク質を一夜37°Cで消化した。5%トリフルオロ酢酸で消化を停止し、50%アセトニトリル中で5%トリフルオロ酢酸を用いて3回、ペプチドを抽出した。抽出液を回収し、乾燥させ、4%メタノール中の1% formic acidに再懸濁し、OLIGO R3カラム (PerSeptive Biosystems社製) に供給した。カラムを1% formic acidで洗浄した後、70%メタノール中の1% formic acidでペプチドを溶出した。

(6) タンパク質の同定  
溶出したペプチドは、Au/Pd被覆したnanoES spray capillaries (Protona社製) に供し、Q-TOF mass spectrometer (Micromass社製) のnanoflow Z-spray sourceに挿入した。Q-TOFの操作、データの蓄積、データ分析はMasslynx/Biolynx 3.2 software (Micromass社製) を用いて行った。Q-TOFは最初はMSモードで、次いでMS/MSモードで操作し、MS/MSモードで得られたデータからペプチドのアミノ酸配列を類推した。得られたアミノ酸配列は、SwissProtデータベースおよびGenBankデータベース

で検索した。

## 2. 結果

まず、四塩化炭素で処理したラット肝臓の組織学的検査から、このラットが肝線維症を発症していることが確認された。また、活性化星細胞のマーカーとして知られている $\alpha$ -平滑筋アクチンおよびPDBF  $\beta$ -レセプターに対する抗体を用いたウエスタンブロット分析から、四塩化炭素で処理したラット肝臓ではこれらのタンパク質発現が増加していることが確認された。

【0022】この肝線維症ラットの肝臓由来星細胞 (in vivo活性化星細胞) および正常肝星細胞のタンパク質2-Dゲルは、図1および図2に示したとおりである。図1Aは正常肝星細胞の細胞タンパク質であり、図1Bはin vivo活性化星細胞の細胞タンパク質である。また、図2Aは正常肝星細胞の分泌タンパク質、図2Bはin vivo活性化星細胞の分泌タンパク質である。正常肝星細胞と活性化星細胞で発現レベルの異なるタンパク質の存在が観察される。例えば、図3Aは図1Aの部分拡大図であり、図3Bは図1B、図3Cは図2A、図3Dは図2Bのそれぞれ部分拡大図である。これら図3から、Galectin-1、CalgizarinおよびCalcyclinの3種類のタンパク質が、活性化星細胞において発現量を増加させていることが確認される。

【0023】表1は、これらの発現レベルの異なるタンパク質のリストであり、in vitro活性化星細胞における発現レベルも併せて表示した。また、この表1に示した以下のタンパク質:  $\alpha$ -actin, Collagen  $\alpha 1(I)$ , Collagen  $\alpha 1(III)$ , Collagen  $\alpha 1(I)$  c-terminal propeptide, Collagen  $\alpha 1(III)$  c-terminal propeptide, Collagen  $\alpha 2(I)$  c-terminal propeptide, 72 KD collagen type IV (MMP-2), Neural cell adhesion molecule, SPARCおよびStromelysin-1の10種は、すでに活性化星細胞での発現レベルの増減が知られているタンパク質である。これらの10種のタンパク質の発現レベルが、既に報告されたものと、この実施例の分析データにける発現レベルとで同一であったことから、この実施例において新たに発現レベルの変化が見出された19種のタンパク質が、活性化星細胞の指標として有効であることが確認された。

【0024】

【表1】

Name (c*/s†)	Expression level** after stellate cell activation	Estimated relative expression level***		
		Quiescent stellate cells	In vivo activated stellate cells	In vitro activated stellate cells
$\alpha$ -actin <sup>‡</sup> (c)	Up	1	8.65	27.08
$\gamma$ -actin (c)	Up	1	3.30	2.31
$\alpha$ -1-antitrypsinase (s)	Down	1	0	0
Aryl sulfotransferase (c)	Down	1	0.08	0.16
Cofilin (c)	Up	1	13.24	8.21
Calcyclin <sup>¶</sup> (c, s)	Up	1 (c)	10.05 (c)	25.31 (c)
Calgizzarin <sup>¶</sup> (c, s)	Up	1 (c)	9.80 (c)	29.76 (c)
Cartilage-associated CASP protein (c)	Up	1	4.76	8.87
Cathepsin D (s)	Up	1	3.61	2.36
Collagen $\alpha$ 1 (I) <sup>‡</sup> (c, s)	Up	1 (c)	81.43 (c)	10.29 (c)
Collagen $\alpha$ 1 (II) <sup>‡</sup> (c)	Up	0	0	0
Collagen $\alpha$ 1 (I) c-terminal propeptide <sup>‡</sup> (s)	Up	1	11.76	5.52
Collagen $\alpha$ 1 (II) c-terminal propeptide <sup>‡</sup> (s)	Up	1	8.12	10.18
Collagen $\alpha$ 2 (I) c-terminal propeptide <sup>‡</sup> (s)	Up	1	6.13	7.21
72 KD collagenase type IV (MMP-2) <sup>‡</sup> (s)	Up	1	2.42	2.56
Dextrin (c)	Up	1	7.06	8.50
Expressed sequence tag (EST: AA376979) (c)	Down	1	0.02	0
F-actin capping protein $\beta$ (c)	Up	1	33.03	11.97
Farnesyl pyrophosphate synthetase (c)	Up	1	45.57	66.24
Galectin-1 <sup>¶</sup> (c, s)	Up	1 (c)	4.837 (c)	9.97 (c)
$\gamma$ -enolase (c)	Up	1	4.88	6.10
Guanine aminohydrolase (c)	Down	1	0.20	0.28
HPAST protein (c)	Down	1	0.25	0.09
Liver carboxylesterase 10 <sup>¶</sup> (c)	Down	1	0	0
Neural cell adhesion molecule <sup>‡</sup> (c)	Up	1	14.00	16.00
Serine protease (s)	Up	1	6.42	9.59
Serine protease inhibitor 3 (s)	Down	1	0.06	0.1
SPARC <sup>‡</sup> (s)	Up	1	2.89	2.98
Stromelysin-1 (MMP-3) <sup>‡</sup> (s)	Down	1	0	0

図4は、これら19種のタンパク質について、in vivo 活性化星細胞と正常星細胞との発現レベルを相対値化したグラフである。この図4から明らかなように、これらの19種のタンパク質の発現レベルは、正常肝星細胞と活性化星細胞では明らかに相違していることから、これらのタンパク質の発現レベルを指標とすることによって、星細胞の活性化状態と、それによる肝障害を正確に診断可能であることが確認された。

【0025】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、肝星細胞の少なくとも1種以上のタンパク質の発現レベルを測定することによって、肝障害を正確に診断することのできる新規な方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】Aは正常肝星細胞、Bはin vivo活性化星細胞のそれぞれの細胞タンパク質の2-D PAGEである。

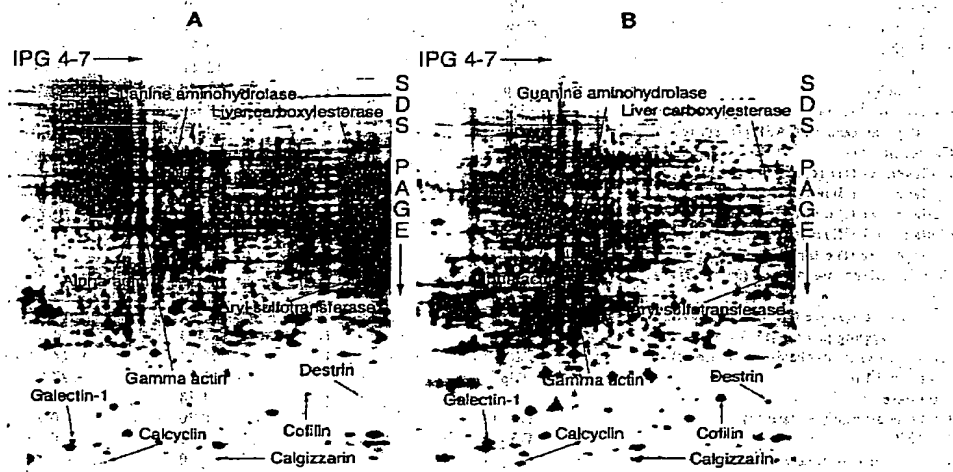
【図2】Aは正常肝星細胞、Bはin vivo活性化星細胞のそれぞれの分泌タンパク質の2-D PAGEである。

【図3】Aは図1Aの部分拡大図であり、図3Bは図1B、図3Cは図2A、図3Dは図2Bのそれぞれ部分拡大図である。

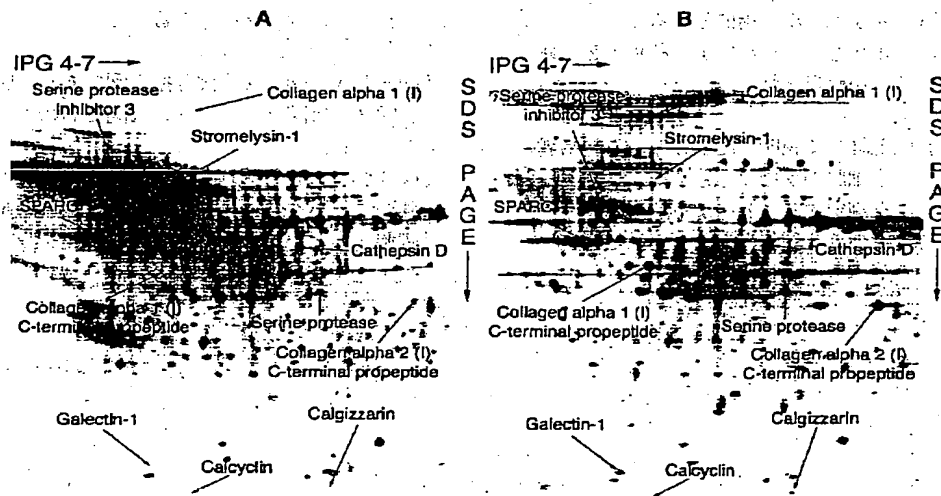
【図4】この発明における発現レベル測定対象である19種のタンパク質について、in vivo活性化星細胞と正常星細胞との発現レベルを相対値化したグラフである。



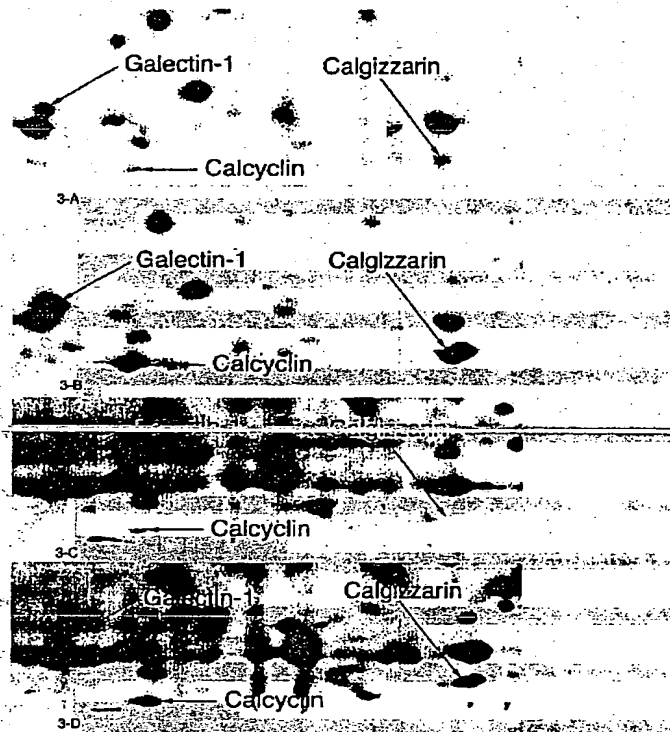
【図1】



【図2】

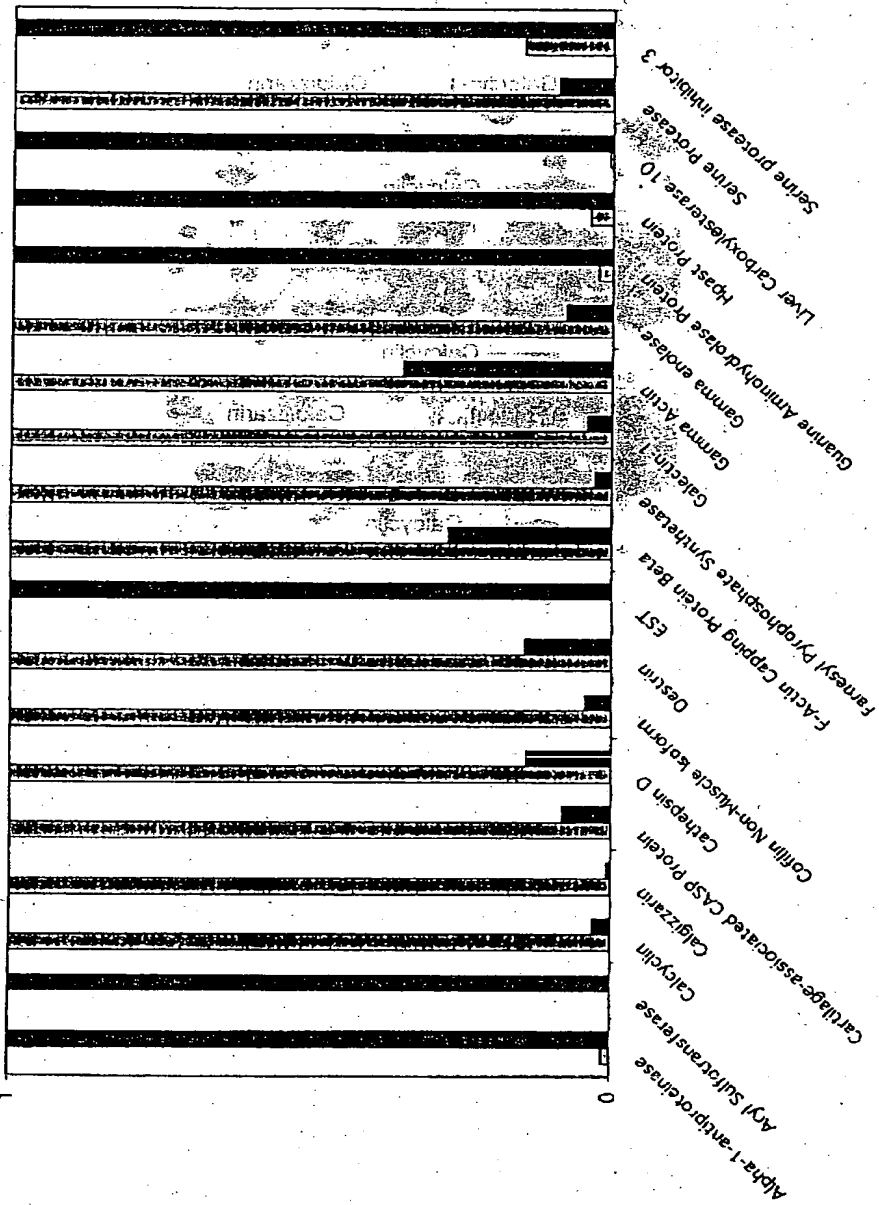


【図3】



[4]

Activated HSC  
Primary HSC



!(9) 001-188069 (P2001-185JL8

フロントページの続き

(72)発明者 今村 邦彦  
広島県安芸郡海田町西浜8番23号

(72)発明者 宮本 夕佳  
広島県東広島市西条中央6-5-10-302  
Fターム(参考) 2G045 AA25 CB01 CB26 DA36 DA77  
GC30 JA01 JA06